

3-氰基吡啶水合酶的纯化及性质*

赵爱民 李文忠 杨惠芳

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 马红球菌 (*Rhodococcus equi*) SHB-121 胞内 3-氰基吡啶水合酶经硫酸铵分级沉淀、DEAE-cellulose DE52 和羟基磷灰石柱层析并经过 Sephadex G-25 处理, 得到了聚丙烯酰胺凝胶电泳均一的 3-氰基吡啶水合酶, 纯化了 31 倍。该酶由一条肽链组成, 其分子量为 30kD, 等电点为 4.1。3-氰基吡啶水合酶能催化 3-氰基吡啶水合生成尼克酰胺。酶反应最适 pH 为 8.0, 最适温度为 30℃。Ag⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 及 NH₄⁺ 对酶活力有强烈抑制作用。当以 3-氰基吡啶为底物时, 其 K_m 为 0.1mol/L。NaCN 为该酶反竞争性抑制剂, 其 K_i 为 5mmol/L。

关键词 微生物转化, 3-氰基吡啶水合酶, 尼克酰胺

有关腈化物的微生物转化机理研究已有很多报道^[1-5]。3-氰基吡啶水合酶 (3-cyanopyridine hydratase) 能催化水合 3-氰基吡啶 (3-cyanopyridine) 生成尼克酰胺 (Nicotinamide)。前文已报道了从长期被腈化物污染的土壤中筛选到的马红球菌 (*Rhodococcus equi*) SHB-121 的 3-氰基吡啶水合酶的形成条件^[6], 本文报道酶的纯化及其性质。

1 材料和方法

1.1 菌种来源和培养条件^[6]

1.2 酶活力测定

在总体积为 2.0ml 的反应液中, 含 0.1ml 0.4mol/L 的 3-氰基吡啶水溶液, 0.1ml 适宜浓度的酶液以及于 25℃ 预保温的终浓度为 0.16mol/L KH₂PO₄-NaOH 缓冲液 (pH8.0), 于 25℃ 反应 15 分钟, 加入 0.1ml 2mol/L HCl 终止反应。用 HPLC 法^[7]测定反应液中尼克酰胺生成量。规定 1 分钟内催化水合 3-氰基吡啶生成 1.0μmol 尼克酰胺所需的酶量为一个活力单位 (u)。

1.3 蛋白测定

采用 Coomassie Brilliant Blue G-250 比色法测定^[8]。

1.4 仪器及试剂

高效液相色谱仪 (HPLC, M201, Waters Ltd.), 温度梯度培养器 (Temp. Gradient Incubator, TN-3F, T. K. S, Kaisha Ltd), 超声破碎器 (Labsonic 2000, B. Braun Co.), 可见紫外分光光度计 (DU-7) 和 pH 计 (Φ71) 均为 Beckman 产品。

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1993 年 9 月 10 日收到。

尼克酰胺、尼克酸及 3-氰基吡啶、甲基丙烯酰胺均购自 Aldrich Chemical Co., Sephadex G-25 及载体两性电解质均为 Pharmacia 产品, 标准蛋白为 Sigma 产品, DEAE-cellulose DE52 为 Whatman 产品, 其余均为市售分析纯试剂。

2 结果

2.1 3-氰基吡啶水合酶的纯化 (为使酶活稳定, 提纯操作均在 4℃ 进行)

2.1.1 粗酶液制备: 收集的洗涤细胞悬浮于 pH7.0, 0.06mol/L 磷酸盐缓冲液中, 冰浴超声破碎 (19KHZ, 200W, 2min×1, 1min×1) 后, 离心 (10000×g, 30 分钟) 除去细胞碎片。

2.1.2 硫酸铵分级: 在搅拌下将硫酸铵缓慢加入粗酶液至 50% 饱和度, 静置过夜, 离心去沉淀, 继续添加硫酸铵至 75% 饱和度, 离心, 将沉淀溶于适量 pH8.0 的 0.06 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 并对相同缓冲液透析除盐。

2.1.3 DEAE-cellulose DE52 柱层析: 将脱盐样品加到用 pH8.0 的 0.06mol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 DEAE-cellulose DE52 柱上 (2.6×30cm)。先用含浓度为 0.2mol/L NaCl 的平衡缓冲液洗脱 1 小时 (30ml/h), 然后改用含 0.35mol/L NaCl 的同样缓冲液以同样流速继续洗脱。将具有 3-氰基吡啶水合酶活力的流分合并, 经硫酸铵沉淀、离心、浓缩后, 对 0.02mol/L pH7.0 的磷酸盐缓冲液透析备用。

2.1.4 羟基磷灰石柱层析: 将上述脱盐样品加到用 pH7.0 的 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液平衡的羟基磷灰石柱上 (1.3×10cm), 以 pH7.0 的磷酸盐缓冲液线性梯度 (0.02—0.10mol/L) 洗脱, 流速 10ml/h, 每管 5ml。对 pH7.0 的 0.06mol/L 磷酸盐缓冲液透析, 其余操作均同步骤 3 (图 1)。

将上述样品加到用 pH7.0 的 0.06mol/L 磷酸盐缓冲液平衡好的 Sephadex G-25 柱上 (1.7×100cm) 并洗脱, 流速 15ml/h, 每管 3ml, 将有酶活部分合并。

经以上步骤, 获得了在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Disc-PAGE) 分析中呈现单一蛋白带的纯 3-氰基吡啶水合酶 (图 2), 各步纯化结果如表 1。

表 1 3-氰基吡啶水合酶的纯化

Table 1 Purification of 3-cyanopyridine hydratase from *Rhodococcus equi* SHB-121

纯化步骤 Step	总体积 Volume (ml)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (u/mg)	纯化倍率 Purification (fold)	得率 Recovery (%)
粗酶液 Crude extract	315	551.3	2.4	1.0	100.0
硫酸沉淀 (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	63	76.2	11.7	4.9	13.8
DEAE-cellulose DE52	22	51.3	25.5	10.6	9.3
羟基磷灰石柱层析 Hydroxyapatite	28	21.0	46.6	19.4	3.8
Sephadex G-25	25	6.1	74.4	31.0	1.1

2.2 酶的性质

2.2.1 分子量测定: 按 SDS-PAGE^[9] 方法测定 (图 3), 以标准蛋白分子量对数对 R_m 作

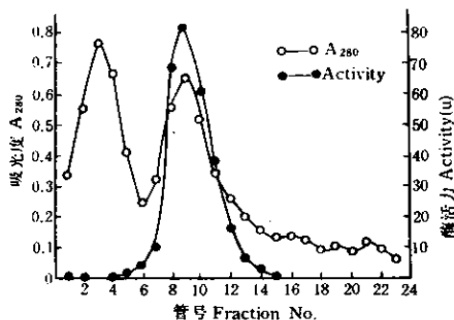


图1 羟基磷灰石柱层析

Fig. 1 Chromatography of the 3-cyanopyridine hydratase on hydroxyapatite column

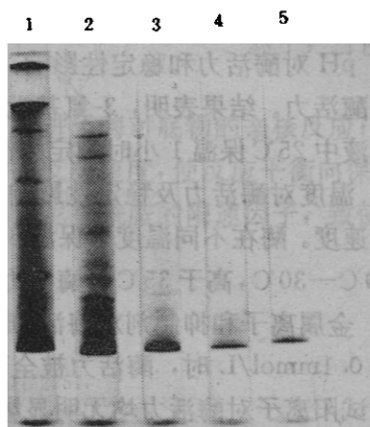
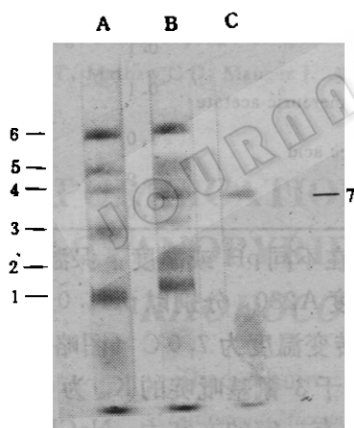


图2 电泳图谱

Fig. 2 Disc-PAGE pattern of the enzyme

1. 粗酶液 Crude extract;
2. 硫酸铵沉淀 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation;
3. DEAE-cellulose DE52 层析产物
DEAE-cellulose DE52 chromatography product;
4. 羟基磷灰石柱层析产物
Hydroxyapatite chromatography product;
5. Sephadex G-25.

图3 纯化的3-氰基吡啶水合酶
SDS-PAGE 图谱Fig. 3 SDS-PAGE pattern of the purified
3-cyanopyridine hydratase

A. 标准蛋白 Standard proteins;

1. Lysozyme (14 300); 2. β -lactoglobulin (18 400);
3. Trypsinogen (24 000); 4. Pepsin (34 700);
5. Egg albumin (45 000); 6. Borin albumin (66 000).

B. 标准蛋白+3-氰基吡啶水合酶

Six standard proteins mixed with 3-cyanopyridine hydratase;

C. 提纯的3-氰基吡啶水合酶

Purified 3-cyanopyridine hydratase.

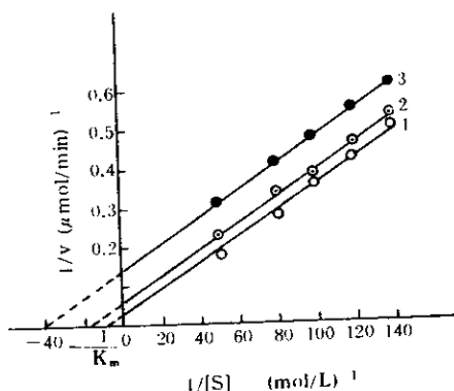


图4 NaCN 对3-氰基吡啶水合酶的抑制

Fig. 4 Inhibition of 3-cyanopyridine hydratase by
sodium cyanide

NaCN concentration:

1. 0; 2. 5mmol/L; 3. 10mmol/L.

图,求得 3-氰基吡啶水合酶分子量为 30kD,该酶由一条肽链组成。

2.2.2 等电点:由薄层凝胶等电聚焦法^[10]测得该酶的等电点 pI 为 4.1。

2.2.3 pH 对酶活力和稳定性影响:在 pH6.0—9.0 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液中,分别测定酶活力。结果表明,3-氰基吡啶水合酶的最适 pH 为 8.0 (图略)。在上述不同 pH 的缓冲液中 25℃ 保温 1 小时测定酶活力。结果表明,该酶在 pH8.5 时最稳定。

2.2.4 温度对酶活力及稳定性影响:该酶在 20℃—30℃ 下反应均可获得高而稳定的表观反应速度。酶在不同温度下保温 60 分钟,酶稳定性测定结果表明,该酶的稳定温度范围为 20℃—30℃,高于 35℃ 时酶活力很快丧失,表明 3-氰基吡啶水合酶的热稳定性较差。

2.2.5 金属离子和抑制剂对酶活力影响:结果列于表 2。当反应液中含有的 Ag^+ 、 Hg^{2+} 浓度为 0.1mmol/L 时,酶活力被全部抑制。 Cu^{2+} 对酶活力也显示了较强烈的抑制作用。其余所试阳离子对酶活力均无明显影响。巯基抑制剂乙酸苯汞和 NaCN (均为 0.1mmol/L) 对酶活抑制分别为 53.9% 和 21.7%。

表 2 金属离子及抑制剂对 3-氰基吡啶水合酶活力的影响

Table 2 Effect of chemicals and inhibitors on activity of 3-cyanopyridine hydratase

阳离子 Cation	浓度 Concentration (mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)	阳离子 Cation	浓度 Concentration (mmol/L)	相对酶活力 Relative activity (%)
AgNO_3	0.1	0.0	CoCl_2	1.0	96.7
HgCl_2	0.1	0.0	MnCl_2	1.0	97.2
CuCl_2	1.0	38.7	FeCl_3	1.0	105.1
NH_4Cl	10.0	43.2	NaCN	0.1	21.7
NiCl_2	1.0	72.2	乙酸苯汞 Phenyl mercuric acetate	0.1	53.9
CaCl_2	1.0	77.8	碘乙酸 Iodoacetic acid	1.0	86.0
ZnCl_2	1.0	78.1	EDTA	1.0	100.0
MgCl_2	1.0	83.3	None	1.0	100.0
CdCl_2	1.0	88.9			

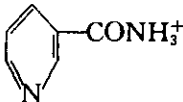
2.2.6 酶的 pH 和温度差光谱:将一定量酶液分别在不同 pH 或温度下保温一定时间后,在波长 220—450nm 范围对酶进行扫描,记录吸光度 A₂₈₀,分别以 pH4.0 和 4℃ 的吸光度为参比,3-氰基吡啶水合酶的转变 pH 为 6.0,转变温度为 7.0℃ (图略)。

2.2.7 酶反应动力学测定:3-氰基吡啶水合酶作用于 3-氰基吡啶的 K_m 为 0.1mol/L (图 4), V_{\max} 为 31.3 $\mu\text{mol}/\text{min}$,对最简单底物 NaCN 具有一定的亲和力,NaCN 为该酶的反竞争性抑制剂 (图 4),其 K_i 为 5mmol/L。

研究了底物 3-氰基吡啶和产物尼克酰胺对该酶的抑制作用,发现当底物浓度高于 30mmol/L 时,呈现了底物的抑制作用。产物抑制作用结果 (以底物转化最多时的酶活力为 100% 计) 表明,当产物浓度 0.2mol/L 时,相对酶活力呈最高值。

3 讨论

在已报道的腈化物转化反应中起作用的脂腈^[11]或芳腈水合酶^[12]均为寡聚蛋白,而本文所纯化的马红球菌 SHB-121 3-氰基吡啶水合酶则为单肽链的酶,分子量 30kD,这与以前多位学者的研究结果不同。由酶的 pH 及温度差光谱表明, pH6.0 和 7℃ 是该酶光谱特性转变点,这和前述酶的等电点和温度稳定性测定结果是一致的,当酶在高于 7℃ 或

pH6.0 的溶液中, 酶的空间构象发生了明显的改变。关于尼克酰胺对酶反应活性的特殊抑制现象, 可能是由于尼克酰胺在溶液中水化形成了  离子, 当它在一定

浓度范围内, 有利于极性底物 3-氰基吡啶的极化, 促进了酶对底物的亲核反应; 当产物浓度过高时, 影响了酶-底物复合物离解为产物和酶的反应速度, 使反应平衡向保留酶-底物复合物的方向移动, 成为酶促水合 3-氰基吡啶形成尼克酰胺的限速因子, 致使酶反应表现速率下降。

参 考 文 献

- [1] Asano Y, Tani Y, Yamada H. *Agric Biol Chem*, 1980, **44** (9): 2251.
- [2] Thimann K, Mahadevan S. *Arch Biochem Biophys*, 1964, **105**: 133.
- [3] Uematsu T. *Arch Biochem Biophys*, 1974, **162**: 614.
- [4] 李文忠, 张鸿翼, 杨惠芳. *微生物学报*, 1990, **30** (1): 29.
- [5] Nagasawa T, Yamada H. *Trends in Biotechnology*, 1989, **7** (6): 153.
- [6] 赵爱民, 李文忠, 杨惠芳. *微生物学报*, 1994, **34** (2): 131.
- [7] 李文忠. *色谱*, 1993, **11** (2): 76.
- [8] Bradford M. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248.
- [9] King J. *J Mol Biol*, 1971, **62**: 465.
- [10] Vesterberg O. *Methods in Enzymology*, 1971, **22**: 389.
- [11] Li Wenzhong, Zhang Yiqiang, Yang Huifang. *Appl Biochem and Biotech*, 1993, **36** (3): 171.
- [12] Nagasawa T, Mathew C D, Mauger J. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1766.

PURIFICATION AND PROPERTIES OF 3-CYANOPYRIDINE HYDRATASE FROM *RHODOCOCCUS EQUI* SHB-121

Zhao Aimin Li Wenzhong Yang Huifang

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract 3-cyanopyridine hydratase from cell-free extract of methylacrylamide-induced *Rhodococcus equi* SHB-121 was purified by ammonium sulfate precipitation and column chromatography on DEAE-cellulose DE52, hydroxyapatite and Sephadex G-25. The enzyme was purified over 31-fold. The molecular weight of the enzyme estimated with SDS-PAGE was 30kD. The pI value was 4.1. The optimum pH and temperature for the hydration were 8.0 and 30°C, respectively. The enzyme activity was inhibited by Ag⁺, Hg²⁺ and Cu²⁺ strongly. The transition temperature and pH were 7.0°C and 6.0, resulted from the differential spectra. The K_m value for 3-cyanopyridine was 0.1mol/L. Sodium cyanide was anticompetitive inhibitor, the K_i value was 5mmol/L.

Key words Microbial conversion, 3-cyanopyridine hydratase, Nicotinamide